

DOCKET NO.: 264642US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Harald GROEGER et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/EP03/07246

INTERNATIONAL FILING DATE: July 7, 2003

FOR: COUPLED ENZYMATIC REACTION SYSTEM USING A FORMATE
DEHYDROGENASE DERIVED FROM CANDIDA BOIDINII

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**

Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

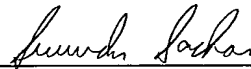
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Germany	102 33 046.8	20 July 2002

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/EP03/07246. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

BEST AVAILABLE COPY



ED03/07246

REC'D 19 AUG 2003

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 102 33 046.8

Anmeldetag: 20. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Degussa AG, Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem
unter Einsatz einer Formiatdehydrogenase aus
Candida boidinii

IPC: C 12 N, C12 M, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Hoß

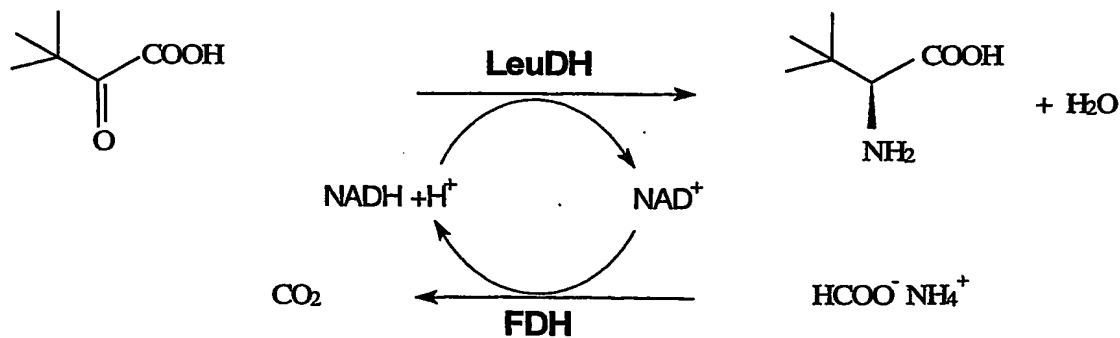
**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1 OF THE PCT

Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem unter Einsatz einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*

Die vorliegende Erfindung betrifft ein gekoppeltes enzymatisch arbeitendes Reaktionssystem, welches sich dadurch auszeichnet, dass es in einem zwei Phasen aufweisenden Lösungsmittelgemisch arbeitet. Insbesondere richtet sich die Erfindung auf ein Reaktionssystem umfassend eine cofaktorabhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung und eine enzymatische Cofaktorregeneration unter Einsatz einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (bzw. darauf basierenden Mutanten) im selben System.

Die Gewinnung optisch aktiver organischer Verbindungen, z.B. Alkohole und Aminosäuren, auf biokatalytischem Wege gewinnt zunehmend an Bedeutung. Als ein Weg zur großtechnischen Synthese dieser Verbindungen hat sich der gekoppelte Einsatz zweier Dehydrogenasen unter Cofaktorregenerierung gezeigt (DE19753350).

Schema 1:



In situ Regeneration von NADH mit der NAD-abhängigen Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bei der reduktiven Aminierung von Trimethylpyruvat zu L-tert-Leucin (Bommarius et al. Tetrahedron Asymmetry 1995, 6, 2851-2888).

Die im wässrigen Medium effizient eingesetzten Biokatalysatoren weisen neben ihrer katalytischen Eigenschaft und Effizienz zudem den Vorteil auf, dass im Gegensatz zu einer Vielzahl an synthetischen metallhaltigen Katalysatoren auf den Einsatz metallhaltiger, insbesondere schwermetallhaltiger und somit toxischer Einsatzstoffe verzichtet werden kann. Auch kann auf den Einsatz von teuren und zudem gefährlichen Reduktionsmitteln wie beispielsweise Boran bei der asymmetrischen Reduktion verzichtet werden.

Allerdings treten Schwierigkeiten bei der Umsetzung von Substraten auf, die schlecht wasserlöslich sind. Ähnliche Schwierigkeiten liegen bei schlecht wasserlöslichen Produkten vor. Dies ist insbesondere bei der Herstellung von optisch aktiven Alkoholen gemäß obigem Konzept der Fall, da die als Ausgangsverbindungen benötigten Ketone eine deutlich geringere Löslichkeit aufweisen als die in Schema 1 eingesetzten α -Ketosäuren.

Eine prinzipiell denkbare Lösung wäre die Durchführung der biokatalytischen Reduktion unter Einsatz einer Alkoholdehydrogenase und einer Formiatdehydrogenase in einem polaren organischen Solvens bzw. einer wässrigen Lösung daraus. Hierbei sollten sowohl Enzyme als auch Substrat und ggf. Produkt löslich sein. Ein genereller Nachteil einer direkten Gegenwart eines organischen Solvens stellt allerdings die im Allgemeinen auftretende erhebliche Verminderung der Enzymaktivität unter diesen Bedingungen dar (siehe z.B. Anderson et al., *Biotechnol. Bioeng.* **1998**, 57, 79-86). Insbesondere die Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* als einziges bislang im technischen Maßstab eingesetztes und in kommerziellen Mengen zugängliches NADH-Regenerierungsenzym weist bedauerlicherweise eine hohe Empfindlichkeit gegenüber organischen Solventien auf (EP1211316). Dieses zeigt sich auch im Vergleichsbeispiel 1 unter Verwendung von DMSO,

Sulfolan, MTBE, Aceton, Isopropanol und Ethanol etc. als organischer Solvenskomponente bei Zusatzmengen von jeweils nur 10% Volumenanteil (siehe Fig. 1).

5 Zur Lösung dieses Problems betreffend einer Stabilisierung der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* in Gegenwart organischer Solventien sind verschiedene Ansätze bekannt, z.B. die Durchführung von Reaktionen durch zusätzlichen Einsatz von Tensiden als oberflächenaktive Stoffe. Nachteilig zeigt sich dabei aber die etwa um den Faktor 40
10 (!) verminderte Reaktionsgeschwindigkeit sowie die auftretende Inhibierung der Formiatdehydrogenase (B. Orlich et al., *Biotechnol. Bioeng.* 1999, 65, 357-362.). Die Autoren bemerken zudem, dass aufgrund der niedrigen Stabilität der Alkoholdehydrogenase ein Reduktionsprozeß
15 unter diesen Bedingungen einer Mikroemulsion nicht ökonomisch ist. Gleiches gilt prinzipiell auch für die in der EP340744 dargestellte Methode, bei der lyotrope Mesophasen als Reaktionsort in Gegenwart von einer wässrigen und/oder organischen Phase gewählt wurden.

20 Eine weitere prinzipielle Möglichkeit der Durchführung von biokatalytischen Reaktionen besteht in der Anwendung immobilisierter Enzyme im organischen Solvens oder die Verwendung von Enzymen in einer homogenen Lösung, bestehend aus Wasser und einem wassermischbaren organischen Solvens.
25 Allerdings sind die Erfolge bei diesen Techniken bei den es zu einem direkten Kontakt von organischem Solvens und Enzym kommt, auf wenige Enzymklassen, insbesondere Hydrolasen, begrenzt. So wird in DE4436149 bemerkt, dass die „direkte Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (wassermischbar
30 oder nicht wassermischbar) nur von wenigen Enzymen vertragen wird, die zur Klasse der Hydrolasen gehören.“ Wenige weitere Beispiele aus anderen Enzymklassen sind zwar in der Zwischenzeit bekannt (so u.a. Oxynitrilasen und eine FDH aus Hefe), die in DE4436149 gemachte Feststellung
35 besitzt aber für die Mehrzahl der Enzyme nach wie vor

Gültigkeit. So ist eine effiziente Immobilisierung der FDH aus *Candida boidinii* nicht bekannt. Zudem ist die Immobilisierung selbst mit zusätzlichen Kosten durch den Immobilisierungsschritt sowie die

5 Immobilisierungsmaterialien verbunden.

Technisch wurden deshalb Verfahren entwickelt, die die Gegenwart organischer Lösungsmittel aufgrund der Gefahr der Desaktivierung bzw. Denaturierung der Enzyme vermeiden. So beschreibt DE4436149 ein Verfahren, bei dem das Produkt aus

10 der Reaktionslösung durch eine produktdurchlässige, insbesondere hydrophobe Membran in ein organisches Lösungsmittel extrahiert wird. Verglichen mit einem Standardverfahren in einem Rührkesselreaktor ist dieses Verfahren allerdings technisch deutlich aufwendiger, zudem

15 sind auch die benötigten organischen Membranen ein zusätzlicher Kostenfaktor. Darüber hinaus ist diese Methode nur für kontinuierliche Prozesse geeignet. Weiterhin ist es ein Nachteil, dass die erzielbaren Raumzeitausbeuten bei dieser Verfahrensweise vergleichsweise gering sind.

20 Beispielsweise wird bei der Reduktion von Acetophenon nur eine Raumzeitausbeute von 88 g/(L*d) erreicht (S. Rissom et al., *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, 10, 923-928). Dabei ist zu beachten, dass Acetophenon selbst noch ein relativ gut wasserlösliches Keton darstellt und die meisten analogen

25 substituierten Acetophenonketone und verwandte Ketone weitaus niedrigere Löslichkeiten besitzen, so dass die Raumzeitausbeute für typische hydrophobe Ketone noch deutlich niedriger liegen sollten. Trotz dieser erheblichen Nachteile gilt dieses Verfahren als bislang bevorzugte

30 Methode für die asymmetrische biokatalytische Reduktion schwer löslicher Ketone unter Verwendung isolierter Enzyme (siehe dazu auch: A. Liese, K. Seelbach, C. Wandrey, *Industrial Biotransformations*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, 2000, S. 103-106).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass somit momentan kein Verfahren bekannt ist, welches die oben aufgeführten Nachteile umgehen hilft und die enzymatische Darstellung schlecht wasserlöslicher Substrate im technischen Maßstab unter Einsatz einer Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* (bzw. darauf basierenden Mutanten) in „direkter“ Gegenwart organischer Solventien gestattet.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, eine Möglichkeit anzugeben, wie insbesondere schlecht wasserlösliche organische Verbindungen einer gekoppelten cofaktorabhängigen enzymatischen Umsetzung in derart ausreichendem Maße zugänglich gemacht werden können, dass eine Anwendung der Umsetzung im technischen Maßstab unter ökonomisch und ökologisch vorteilhaften Voraussetzungen erfolgen kann. Insbesondere war eine Aufgabe, dass ein solches Verfahren sich zur Reduktion von schlecht wasserlöslichen Ketonen eignen sollte und den Einsatz der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* in „direkter“ Gegenwart organischer Solventien (d.h. ohne Trennung durch eine hydrophobe Membran) erlaubt.

Diese Aufgabe wird anspruchsgemäß gelöst. Ansprüche 1 bis 8 richten sich auf ein erfindungsgemäß operierendes Reaktionssystem. Anspruch 9 schützt eine Vorrichtung. Anspruch 10 betrifft ein erfindungsgemäß arbeitendes Verfahren, wohingegen die Ansprüche 11 und 12 auf bevorzugte Verwendungen des erfindungsgemäßen Reaktionssystems gerichtet sind.

Dadurch, dass man ein gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine NADH-abhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung mit einer Alkoholdehydrogenase und eine enzymatische Regeneration des NADHs mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bzw. deren Mutanten in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem, bei dem eine wässrige Phase mit einer flüssigen organischen Phase in Kontakt steht, bereitstellt,

gelangt man insbesondere überraschend, keinesfalls vorhersehbar und erfindungsgemäß besonders vorteilhaft zur Lösung der gestellten Aufgabe. Entgegen der aus dem Stand der Technik ableitbaren Meinung ist es überraschenderweise
5 möglich, trotz Anwesenheit eines organischen Lösungsmittels das gekoppelte enzymatische Reaktionssystem ohne lösungsmittelbedingten Aktivitätsverlust eines der Enzyme, insbesondere der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii*, in für den technischen Maßstab ausreichenden
10 Raumzeitausbeuten arbeiten zu lassen. Die FDH stammt aus dem Organismus *Candida boidinii* selbst oder es können auch weiterentwickelte rec-Mutanten derselben eingesetzt werden (DE19753350). Ganz besonders vorteilhaft ist der Einsatz der Mutante, die die Aminosäureaustausche C23S/C262A
15 aufweist. Besonders überraschend ist dabei, dass die Formatdehydrogenase aus *C. boidinii* trotz der beobachteten hohen Instabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln (siehe dazu Vergleichsbeispiel 1 im experimentellen Teil) unter diesen Bedingungen sehr effizient eingesetzt werden
20 kann.

Das im Reaktionssystem eingesetzte organische Lösungsmittel soll - wie oben dargelegt - mit der vorhandenen wässrigen Phase zwei getrennte Phasen bilden. Im Rahmen dieser Vorgabe ist der Fachmann prinzipiell frei in der Wahl des
25 organischen Lösungsmittels. Es hat sich jedoch als vorteilhaft erwiesen, wenn als organische Phase ein Lösungsmittel gewählt wird, welches eine möglichst geringe Löslichkeit in Wasser besitzt ($\log P$ -Wert ≥ 3 , vorzugsweise $\geq 3,1$, mehr bevorzugt $\geq 3,2$ etc.). Da das organische
30 Lösungsmittel gleichzeitig auch das wenig wasserlösliche Edukt aufnehmen soll, ist darüber hinaus auch wichtig, dass es eine möglichst hohe Löslichkeit für die eingesetzten organischen Verbindungen besitzt.

Derartige organische Lösungsmittel, welche sich bevorzugt
35 im Reaktionssystem einsetzen lassen, sind unter den

gegebenen Reaktionsbedingungen flüssige aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe. Insbesondere n-Pentan, n-Hexan, n-Heptan, n-Octan, Isooctan, Cyclohexan, Methylcyclohexan, sowie deren verzweigt-kettige Isomere sind
5 ganz besonders bevorzugt. Auch halogenierte Kohlenwasserstoffe können eingesetzt werden (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , Chlorbenzol etc.). Als aromatische Kohlenwasserstoffe kommen Toluol, Xylol oder Benzol in Betracht.

Das Mengenverhältnis von organischem Lösungsmittel zu
10 wäßrigem Teil kann beliebig gewählt werden. Das organische Lösungsmittel wird in einer Menge bezogen auf das Gesamtvolumen von 5-80 Vol.-%, vorzugsweise 10-60 Vol.-%, besonders bevorzugt um 50 Vol.-% eingesetzt.

Entgegen dem im Stand der Technik vorgeschlagenem Ansatz,
15 Tenside zur enzymatischen Reaktionsmischung zuzugeben, um die enzymatische Transformation zu beschleunigen, in dem Phasenübergänge bei der Reaktion minimiert werden, belegt die vorliegende Erfindung, dass der Einsatz eines erfindungsgemäßen Reaktionssystems gerade dann besonders
20 erfolgreich verläuft, wenn das System keine Tenside enthält.

Unter Tensiden werden in diesem Zusammenhang alle diejenigen Substanzen verstanden, die befähigt sind, micellare Strukturen aufzubauen bzw. die
25 Oberflächenspannung an flüssig-flüssig Phasengrenzen zu erniedrigen.

Wie schon angedeutet sollte die Konzentration, mit der die Substrate im Reaktionssystem eingesetzt werden, so bemessen sein, dass eine unter ökonomischen Gesichtspunkten
30 vorteilhafte Umsetzung erfolgen kann. Die organische Verbindung sollte daher vor Reaktionsstart vorteilhafterweise in einer Konzentration von >25 mM, vorzugsweise >100 mM, besonders bevorzugt >200 mM und ganz besonderes bevorzugt >500 mM pro L Gesamtvolumen der
35 Lösungsmittel (= Summe der Volumina an organischem Solvens

und wäßrigem Teil) vorliegen. Eine Obergrenze für die Konzentration bildet naturgemäß die Gewährleistung für die Durchführbarkeit der Reaktion, insbesondere sollte Rührbarkeit der Reaktionsmischung in jedem Fall gegeben
5 sein. Man kann jedoch bevorzugt auch über der Sättigungsgrenze für das Substrat bzw. das Produkt arbeiten.

Das gegenständliche gekoppelte enzymatische Reaktionssystem kann erfindungsgemäß in allen den Fachmann für diesen Zweck
10 in Frage kommende enzymatische Reaktionen, bei denen Ketogruppen in Alkoholgruppen umgewandelt werden, eingesetzt werden. Bevorzugt sind wie gesagt jedoch Oxidoreduktase-Reaktionen. Das Verfahren ist für den Einsatz beliebiger Arten von Alkoholdehydrogenasen
15 geeignet. Die erfindungsgemäß eingesetzten Alkoholdehydrogenasen stammen dabei vorzugsweise aus den Organismen *Rhodococcus erythropolis* (S-ADH) oder *Lactobacillus kefir* (R-ADH) (ADH aus *R. erythropolis*: J. Peters, T. Zelinski, M.-R. Kula, Purification and
20 characterization of a novel carbonyl reductase silated from *Rhodococcus erythropolis*, J. Biotechnol. 1994, 33, 283-292) (ADH aus *Lactobacillus kefir*: C. W. Bradshaw, W. Hummel, C.-H. Wong, *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis, J. Org.
5 Chem. 1992, 57, 1532-1536.).

In einer nächsten Ausgestaltung bezieht sich die vorliegende Erfindung auf eine Vorrichtung zur Transformation von organischen Verbindungen, welche das erfindungsgemäße Reaktionssystem aufweist. Vorteilhaft
30 einzusetzende Vorrichtungen sind beispielsweise der Rührkessel oder Rührkesselkaskaden, oder Membranreaktoren, die sowohl im batch-Betrieb als auch kontinuierlich betrieben werden können.

Im Rahmen der Erfindung wird unter Membranreaktor jedwedes
35 Reaktionsgefäß verstanden, bei dem der Katalysator in einem

Reaktor eingeschlossen wird, während niedermolekulare Stoffe dem Reaktor zugeführt werden oder ihn verlassen können. Dabei kann die Membran direkt in den Reaktionsraum integriert werden oder außerhalb in einem separaten

5 Filtrationsmodul eingebaut sein, bei der die Reaktionslösung kontinuierlich oder intermittierend durch das Filtrationsmodul strömt und das Retentat in den Reaktor zurückgeführt wird. Geeignete Ausführungsformen sind u.a. in der WO98/22415 und in Wandrey et al. in Jahrbuch 1998,

10 Verfahrenstechnik und Chemieingenieurwesen, VDI S. 151ff.; Wandrey et al. in Applied Homogeneous Catalysis with Organometallic Compounds, Vol. 2, VCH 1996, S.832 ff.; Kragl et al., Angew. Chem. 1996, 6, 684f. beschrieben. Die in dieser Apparatur neben der batch und

15 semikontinuierlichen Fahrweise mögliche kontinuierliche Fahrweise kann dabei wie gewünscht im Cross-Flow-Filtrationsmodus (Fig. 4) oder als Dead-End-Filtration (Fig. 3) durchgeführt werden. Beide Verfahrensvarianten sind prinzipiell im Stand der Technik beschrieben

20 (Engineering Processes for Bioseparations, Ed.: L.R. Weatherley, Heinemann, 1994, 135-165; Wandrey et al., Tetrahedron Asymmetry 1999, 10, 923-928).

Eine nächste Ausgestaltung der Erfindung beschäftigt sich mit einem Verfahren zur enzymatischen Transformation

25 organischer Verbindungen unter Anwendung des erfindungsgemäßen Reaktionssystems. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Verfahren um die Herstellung einer enantiomer angereicherten organischen Verbindung, vorzugsweise einem chiralen Alkohol. Die Ausgestaltung des Verfahrens kann

30 anhand des beschriebenen Reaktionssystems und den nachfolgend dargelegten Beispielen nach dem Belieben des Fachmanns ausgeführt werden. Es werden unter den gegebenen Randbedingungen die sonst für die enzymatische Umsetzung bekannten Bedingungen entsprechend eingestellt.

Ein nächster Aspekt der Erfindung beschäftigt sich denn auch mit der Verwendung des erfindungsgemäßen Reaktionssystems in einem Verfahren zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen oder zur Diagnose bzw. Analyse organischer Verbindungen, vorzugsweise von Alkoholen. Weiter vorzugsweise wird das erfindungsgemäße Reaktionssystem wie gesagt in einem Verfahren zur Herstellung enantiomer angereicherter organischer Verbindungen, vorzugsweise von Alkoholen eingesetzt.

Überraschenderweise besitzt die Formiatdehydrogenase (FDH) aus *Candida boidinii* gegenüber zweiphasigen Lösungsmittelsystemen eine sehr gute Stabilität. Dies sei anhand der Versuche zur Langzeitstabilität der FDH aus *C. boidinii* in verschiedenen Lösungsmittelsystemen untersucht.

In diesen Versuchen gemäß Vergleichsbeispiel 1, sowie dem erfindungsgemäßen Beispiel 2 wurde jeweils ein Anteil an organischem Solvens von 10% bzw. 20% am Gesamtvolumen gewählt. Im Gegensatz zu den wasserlöslichen organischen Solventien (siehe Vergleichsbeispiel 1), die zu einer schnellen Desaktivierung der FDH aus *Candida boidinii* führen, wurden im Zweiphasensystem, insbesondere bei Verwendung obig erwähnter Kohlenwasserstoffkomponenten wie z.B. n-Hexan, hervorragende Stabilitätseigenschaften der Formiatdehydrogenase aus *C. boidinii* (in diesen Beispielen in Form der Doppelmutante verwendet) auch nach mehreren Tagen noch beobachtet. Während beispielsweise in Gegenwart von Aceton bzw. DMSO die Enzymaktivität innerhalb von 24 Stunden um 35 bzw. 66% abnimmt, sind in Gegenwart von 20 Vol.-% Hexan noch 90% Enzymaktivität selbst nach 3 Tagen zu verzeichnen. Die Ergebnisse mit n-Hexan (Beispiel 2) finden sich in Fig. 1 graphisch dargestellt und Tabelle 3 wieder. Die Vergleichsbeispiele mit anderen organischen Solventien sind ebenfalls in Fig. 1 bzw. Tabelle 1 aufgeführt.

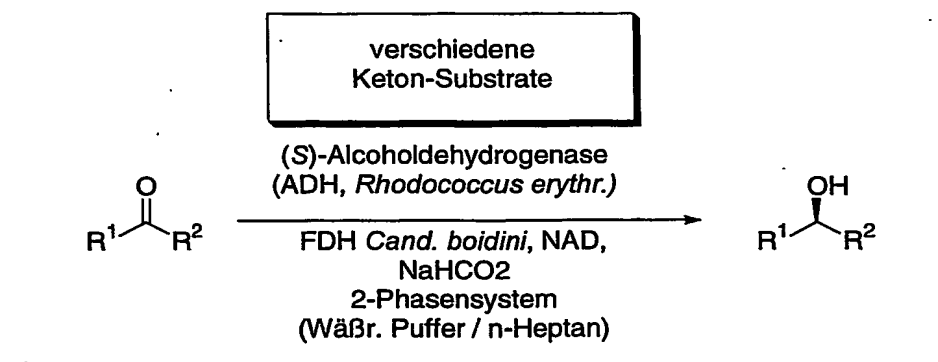
Erfindungsgemäß können auch andere, mit Wasser nicht mischbare und somit zwei Phasen bildende organische

Solventien, im beschriebenen Verfahren eingesetzt werden. So konnte beispielsweise auch mit n-Heptan als organische Solvenskomponente bei einem organischen Solvensanteil von 20% sehr hohe Stabilitäten erzielt werden. Die Stabilität nach 27 Stunden lag hier bei hervorragenden 99.8% (siehe Beispiel 3 und Tabelle 4). Völlig überraschend liegt diese Aktivität damit noch deutlich über der Aktivität einer reinen wässrigen Lösung, was auf eine nicht zu erwartende Stabilisierung der FDH aus *Candida boidinii* durch den Einsatz eines 2-Phasensystems hindeutet (siehe auch experimenteller Teil, Beispiel 3, Tabelle 4 und Fig. 2).

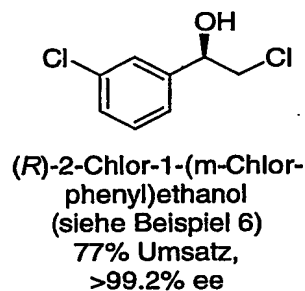
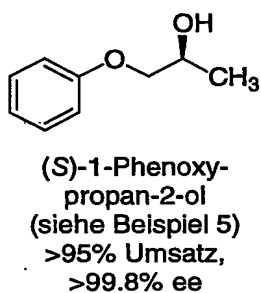
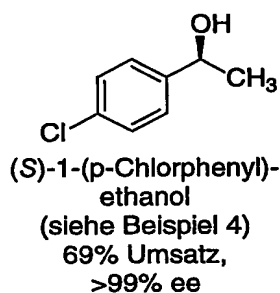
Weiterhin ist zu bemerken, dass das erfindungsgemäße Reaktionssystem es gestattet, die enzymatischen Umsätze beim Einsatz von 2-Phasensystemen mit höherem organischen Volumenanteil erfolgreich durchzuführen. Dies dokumentieren die Versuche, die unter Verwendung von n-Heptan bei höherem Solvensanteil durchgeführt wurden (siehe Beispiel 3, Tabelle 4). Bei einem Volumenanteil des organischen Solvens n-Heptan von 60% konnte ebenfalls eine hohe Aktivität über einen langen Zeitraum beibehalten werden, wie eine Restaktivität von 82.8% nach 27 Stunden verdeutlichen. Die Ergebnisse zur Langzeitstabilität bei unterschiedlichen Volumenanteilen an organischen Solvens (gemäß Beispiel 3, Tabelle 4) sind in der Abbildung Fig. 2 graphisch dargestellt.

Am Beispiel des Systems Alkoholdehydrogenase/NADH/FDH/Ameisensäure kann die vorliegende Erfindung erläutert werden. Die asymmetrische Synthese von Alkoholen wurde ausgehend vom entsprechenden Keton mittels dieses Reaktionssystems durchgeführt.

Schema 2:



Experimentelle Beispiele



Die Aufarbeitung der Reaktionsmischung erfolgte durch Extraktion mit MtBE und Eindampfen der organischen Phase.

- 5 Den entsprechenden Alkohol erhielt man so in einer Ausbeute von 69% und einer Enantioselektivität von 99% in einer apparativ sehr einfachen Art und Weise (Beispiel 4).

- Hervorragende Enantioselektivitäten werden aber auch beim Einsatz anderer Ketone als Ausgangsmaterialien erhalten. So
- 10 resultiert die Reduktion von Phenoxyaceton unter diesen Reaktionsbedingungen zu einem enantiomerenreinen Produkt quantitativ in >99.8% ee (Beispiel 5).

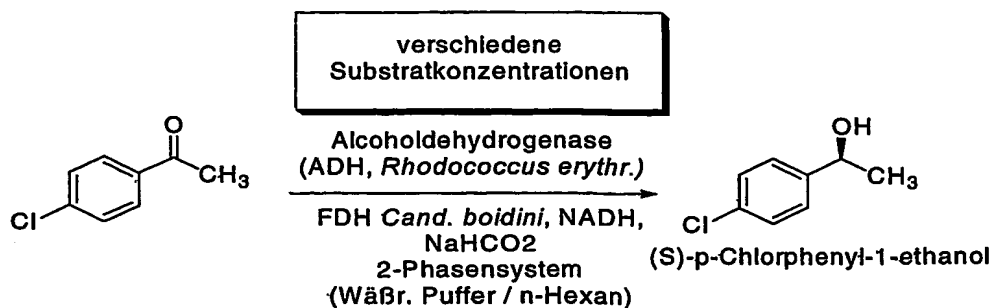
- Weiterhin eignet sich das erfindungsgemäße Reaktionssystem aber auch für sterisch anspruchsvolle Ketone. Dies sei
- 15 exemplarisch am Beispiel des α ,m-Dichloracetophenons dokumentiert. Dieses Keton ist sowohl an der Methylgruppe als auch am aromatischen Ring mit einem Chloratom substituiert. Die biokatalytische Reduktion im 2-

Phasensystem ergibt hier das gewünschte Produkt 2-Chlor-1-(m-Chlorphenyl)-ethanol erneut in hervorragender Enantioselektivität von >99.2% (Beispiel 6). Der Umsatz liegt hier bei 77%.

- 5 Diese hohen Umsätze sowie Enantioselektivitäten sind nicht zuletzt deshalb überraschend, weil durch die Anwesenheit von organischen Solventien oft nicht nur eine Verminderung der Enzym-Aktivität (einhergehend mit einem niedrigen Umsatz) sondern auch eine Veränderung der
- 10 Enzymeigenschaften hinsichtlich Stereospezifität (einhergehend mit einer Verminderung der Enantioselektivität) zu beobachten ist.

- Besonders überraschend aber zeigten sich in diesem Zusammenhang die Ergebnisse der Versuche bei erhöhten
- 15 Substratkonzentrationen. Diese Versuche wurden mit p-Chloracetophenon als Modellsubstrat durchgeführt. Wird in obigem Versuch bei einer Substratkonzentration von 10 mM (diese Substratkonzentration entspricht der Konzentration bei den Versuchen aus dem Stand der Technik) ein Umsatz von
- 20 69% erzielt (Beispiel 4), so konnte dieser Umsatz - entgegen der verbreiteten Ansicht, dass bei erhöhten Substratkonzentrationen aufgrund von Inhibierungen etc. nur verminderten Ausbeuten erzielt werden können -, bei diesem Reaktionstyp nun ab einer Konzentration von 20 mM noch
- 25 gesteigert und höhere Umsätze von 75% (bei 40mM) und 74% (bei 100 mM) erzielt werden (Beispiele 7, 8; Schema 3; Fig. 5).

Schema 3:



Dieses Verfahren eignet sich somit insbesondere auch zur enzymatischen Reduktion von Ketonen bei hohen Substratkonzentrationen.

Ein Hauptvorteil dieses Verfahrens besteht in der
5 Einfachheit des Prozesses. So sind keine aufwendigen
Verfahrensschritte enthalten, und das Verfahren kann sowohl
in Batchreaktoren als auch kontinuierlich durchgeführt
werden. Ebenso werden im Gegensatz zu früheren Verfahren
keine speziellen Membranen, die das wässrige Medium vom
10 organischen Medium trennen, benötigt. Auch die in einigen
bisherigen Prozessen benötigten Tensid-Zusätze entfallen
bei diesem Verfahren. Ein weiterer Hauptvorteil liegt in
der erstmaligen Möglichkeit, die enzymatische Herstellung
15 Substratkonzentrationen von >25 mM zu gestalten. Diese
Vorteile waren aus dem Stande der Technik in naheliegender
Weise so nicht herleitbar.

Enantiomerenangereichert oder enantiomer angereichert
bezeichnet die Tatsache, dass eine optische Antipode im
20 Gemisch mit ihrer anderen zu >50% vorhanden ist.

Die dargestellten Strukturen beziehen sich bei Vorliegen
eines Stereozentrums auf beide möglichen Enantiomere und
bei Vorliegen von mehr als einem Stereozentrum im Molekül
auf alle möglichen Diastereomere und bezüglich eines
25 Diastereomers auf die darunter fallenden möglichen zwei
Enantiomere der in Frage stehenden Verbindung.

Der Organismus *C. boidinii* ist unter der Nummer ATCC 32195
bei der American Type Culture Collection hinterlegt und
öffentlich zugänglich.

30 Unter gekoppeltem enzymatischen System wird erfindungsgemäß
verstanden, dass eine enzymatische Transformation einer
organischen Verbindung unter Verbrauch eines Cofaktors
abläuft und der Cofaktor in situ durch ein zweites

enzymatisches System (hier die FDH aus *C. boidinii* oder deren Mutanten) regeneriert wird. Im Ergebnis führt dies zu einer Verminderung des Einsatzes teurer Cofaktoren.

Die in dieser Schrift genannten Dokumente des Standes der
5 Technik gelten als von der Offenbarung mitumfasst.

Beschreibungen der Zeichnungen:

Fig. 3 zeigt einen Membranreaktor mit Dead-End-Filtration. Das Substrat 1 wird über eine Pumpe 2 in den Reaktorraum 3 überführt, der eine Membran 5 aufweist. Im

5. rührerbetriebenen Reaktorraum befinden sich neben dem Lösungsmittel der Katalysator 4, das Produkt 6 und nicht umgesetztes Substrat 1. Über die Membran 5 wird hauptsächlich niedermolekulares 6 abfiltriert.

Fig. 4 zeigt einen Membranreaktor mit Cross-Flow-

- 10 Filtration. Das Substrat 7 wird hier über die Pumpe 8 in den gerührten Reaktorraum überführt, in dem sich auch Lösungsmittel, Katalysator 9 und Produkt 14 befindet. Über die Pumpe 16 wird ein Lösungsmittelfluß eingestellt, der über einen ggf. vorhandenen Wärmetauscher 12 in die Cross-
15 Flow-Filtrationszelle 15 führt. Hier wird das niedermolekulare Produkt 14 über die Membran 13 abgetrennt. Hochmolekularer Katalysator 9 wird anschließend mit dem Lösungsmittelfluß ggf. wieder über einen Wärmetauscher 12 ggf. über das Ventil 11 zurück in den Reaktor 10 geleitet.

Experimenteller Teil:

Beispiel 1 (Vergleichsbeispiele der FDH-Aktivitäten unter Verwendung einer FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A))

- 5 Es werden 2,72 g (0,8 mol/L) Natriumformiat und 1,14 g (0,1 mol/L) Di-Kalium-Hydrogen-Phosphat-Tri-Hydrat eingewogen und in 40 mL VE-H₂O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung auf 8,2 gestellt. Dann wird die
- 10 Lösung in einen 50 mL-Messkolben überführt und mit VE-H₂O aufgefüllt. Separat dazu werden 71,7 mg (4 mmol/L) NAD⁺-Tri-Hydrat abgewogen und in ca. 20 mL VE-H₂O gelöst. Mit Ammoniak-Lösung (25%) und Ameisensäure (100%), bzw. entsprechenden Verdünnungen, wird der pH-Wert der Lösung
- 15 auf 8,2 gestellt. Dann wird die Lösung in einen 25 mL-Messkolben überführt und mit VE-H₂O aufgefüllt. Anschließend werden jeweils 500 µL der Substratlösung sowie der NADH-Lösung in der zur Messung verwendeten 1 cm-Küvette gemischt. Nach Zugabe von 10 µL der Enzymlösung, wobei als
- 20 Lösungsmittel eine 10%-ige Lösung eines organischen Solvens (siehe Tabelle) in Wasser zum Einsatz kommt, wird kurz geschüttelt, die Küvette ins Photometer gestellt und die Datenaufnahme gestartet. Die Enzymlösung wird erst direkt vor Messbeginn zugegeben. Die Aktivitäten der FDH aus *C.*
- 25 *boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A) werden nach bestimmten Zeitabschnitten durch den photometrischen Nachweis der Reaktion NAD⁺ zu NADH bestimmt. Die photometrische Messung erfolgte bei einer Temperatur von 30° C, einer Wellenlänge von 340 nm und mit einer Meßzeit von 15 min. Die Ergebnisse
- 30 sind anbei in Tabelle 1 und Tabelle 2 dargestellt.

Tab. 1. Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii*
(Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von
Solvens und Zeit

Zeit	Butanol	MEK	DMSO	THF	Sulfolan	Aceto- nitril
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,5262	0,0058	0,7965	0,8492	0,0028	0,7961
0,042	0,0006	0,0011	0,7880	0,4357	0,0003	0,4494
0,125			0,7794	0,0414		0,0840
1,097			0,2669			0,0008
2,035			0,2331			
2,896			0,2201			
5,927			0,1763			
7,885			0,1404			
9,948			0,1205			
13,073			0,0915			
14,892			0,0717			
16,875			0,0540			
19,938			0,0355			

Tab. 2. Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii*
(Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von
Solvens und Zeit

Zeit	Aceton	Ethanol
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,8355	0,8491
0,042	0,7402	0,7689
0,750	0,5893	0,6367
1,000	0,5426	0,5933
1,875	0,3484	0,4687
2,760	0,2691	0,3510
3,781	0,2004	0,2814
4,646	0,1614	0,2240
5,875	0,1325	0,1736
6,778	0,0987	0,1486
7,792	0,0794	0,1277
8,729	0,0610	0,0998
11,750	0,0333	0,0536
13,726		0,0421

Beispiel 2 (Messung der FDH-Aktivitäten der FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A))

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte gemäß der Vorschrift in Beispiel 1, wobei als organische Solvenskomponente Hexan verwendet wurde. Die Ergebnisse sind anbei in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3. Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von Hexan und Zeit

Zeit	Hexan (10%)	Hexan (20%)
[d]	Aktivität [U/ml]	Aktivität [U/ml]
0,000	0,8364	1,0280
0,042	0,9572	0,9952
0,177	0,8223	1,1408
0,899	0,7892	0,9311
2,000	0,6242	0,9467
2,878	0,7654	0,9280

Beispiel 3 (Messung der FDH-Aktivitäten der FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A))

Die Bestimmung der Aktivität erfolgte gemäß der Vorschrift in Beispiel 1, wobei als organische Solvenskomponente n-Heptan verwendet wurde. Die Ergebnisse sind anbei in Tabelle 4 dargestellt, wobei die Auswertung hier prozentual erfolgte und die Ergebnisse bei den einzelnen Substratkonzentrationen sich jeweils auf die mit 100% gekennzeichnete Anfangsaktivität beziehen.

Tab. 4. Enzymaktivität der FDH aus *C. boidinii* (Doppelmutante: C23S/C262A) in U/mL in Abhängigkeit von Hexan und Zeit

Zeit	n-Heptan (0%)	n-Heptan (20%)	n-Heptan (60%)
[h]	Aktivität [%]	Aktivität [%]	Aktivität [%]
0	100,0	100,0	100,0
3	102,3	99,5	88,1
21	92,2	96,7	82,3
27	89,3	99,8	82,8

5 Beispiel 4 (Umsetzung mit p-Chloracetophenon)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL n-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 69%

Enantioselektivität: >99% ee

Beispiel 5 (Umsetzung mit Phenoxyäceton)

- Es werden zu einer Lösung, bestehend aus Phenoxyäceton (76.0 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL *n*-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der
- 5 Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via
- 10 Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität
- 15 (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: >95%

Enantioselektivität: >99.8% ee

Beispiel 6 (Umsetzung mit 2,3'-Dichloracetophenon)

- 20 Es werden zu einer Lösung, bestehend aus 2,3'-Dichloracetophenon (102.7 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 10 mL *n*-Heptan und 40 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer
- 25 Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x
- 30 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch ¹H-NMR-spektroskopische

Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 77%

Enantioselektivität: >99.2% ee

5

Beispiel 7 (Umsetzung mit p-Chloracetophenon bei 40 mM)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 2.5 mL *n*-Heptan und 10 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch ¹H-NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 75%

Beispiel 8 (Umsetzung mit p-Chloracetophenon bei 100 mM)

Es werden zu einer Lösung, bestehend aus p-Chloracetophenon (78.4 mg; 10 mM), Natriumformiat (50 mM) und NADH (2 mM) in 1 mL *n*-Heptan und 4 mL eines Phosphatpuffers, 10.1 U der Alkoholdehydrogenase (aus *Rhodococcus erythropolis*) und 10 U einer Formiatdehydrogenase (FDH aus *C. boidinii*, Expression in *E. coli*, Doppelmutante C23S/C262A) zugesetzt. Das entstandene Reaktionsgemisch wird für 21 Stunden bei 30 °C rühren gelassen. Anschließend arbeitet man via

Extraktion mit 3 x 25 mL MTBE auf und trocknet die gesammelten organischen Phasen mit Natriumsulfat. Das nach dem Entfernen des Lösungsmittels in Vakuum resultierende Rohprodukt wird im Hinblick auf Umsatz (durch ^1H -NMR-spektroskopische Untersuchung) und Enantioselektivität (durch chirale GC) untersucht.

Umsatz: 74%

Patentansprüche:

1. Gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem aufweisend eine NADH-abhängige enzymatische Transformation einer organischen Verbindung mit einer Alkoholdehydrogenase und eine enzymatische Regeneration des NADHs mit der Formiatdehydrogenase aus *Candida boidinii* bzw. deren Mutanten in einem zweiphasigen Lösungsmittelsystem, bei dem eine wässrige Phase mit einer flüssigen organischen Phase in Kontakt steht.
2. Reaktionssystem nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das eingesetzte organische Lösungsmittel eine möglichst geringe Löslichkeit in Wasser und eine möglichst hohe Löslichkeit für die eingesetzten organischen Verbindungen besitzt.
3. Reaktionssystem nach Anspruch 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel unter den Reaktionsbedingungen flüssige aromatische oder aliphatische Kohlenwasserstoffe eingesetzt werden, insbesondere solche mit einem logP-Wert von >3 .
4. Reaktionssystem nach Anspruch 1, 2 und/oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das organische Lösungsmittel in einer Menge von 10 - 60 Vol.-% in Bezug auf das Gesamtvolumen vorhanden ist.
5. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die organische Verbindung vor Reaktionsstart in einer Konzentration von >25 mM pro L Lösungsmittelgemisch, insbesondere >100 mM pro L Lösungsmittelgemisch, vorliegt.

6. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das System keine Tenside enthält.
- 5 7. Reaktionssystem nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym für die Transformation der organischen Verbindung eine Alkoholdehydrogenase aus *Lactobacillus kefir* einsetzt.
- 10
8. Reaktionssystem nach Anspruch einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man als Enzym für die Transformation der organischen Verbindung eine Alkoholdehydrogenase aus *Rhodococcus erythropolis* einsetzt.
- 15
9. Vorrichtung zur Transformation von organischen Verbindungen aufweisend ein Reaktionssystem nach Anspruch 1.
- 20 10. Verfahren zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen unter Anwendung des Reaktionssystems nach Anspruch 1.
11. Verwendung des Reaktionssystems nach Anspruch 1 zur enzymatischen Transformation organischer Verbindungen oder zur Diagnose bzw. Analyse von vorzugsweise Alkoholen.
- 25
12. Verwendung nach Anspruch 11 in einem Verfahren zur Herstellung enantiomer angereicherter organischer Verbindungen, vorzugsweise Alkoholen.

Zusammenfassung:

Das vorliegende Verfahren betrifft ein gekoppeltes enzymatisches Reaktionssystem, welches in einem Zweiphasensystem aus organischer Phase und wässriger Phase durchgeführt wird. Das System arbeitet mit
5 cofaktorabhängigen Enzymen, wobei der Cofaktor ständig enzymatisch durch eine FDH aus *C. boidinii* regeneriert wird.

Fig. 1

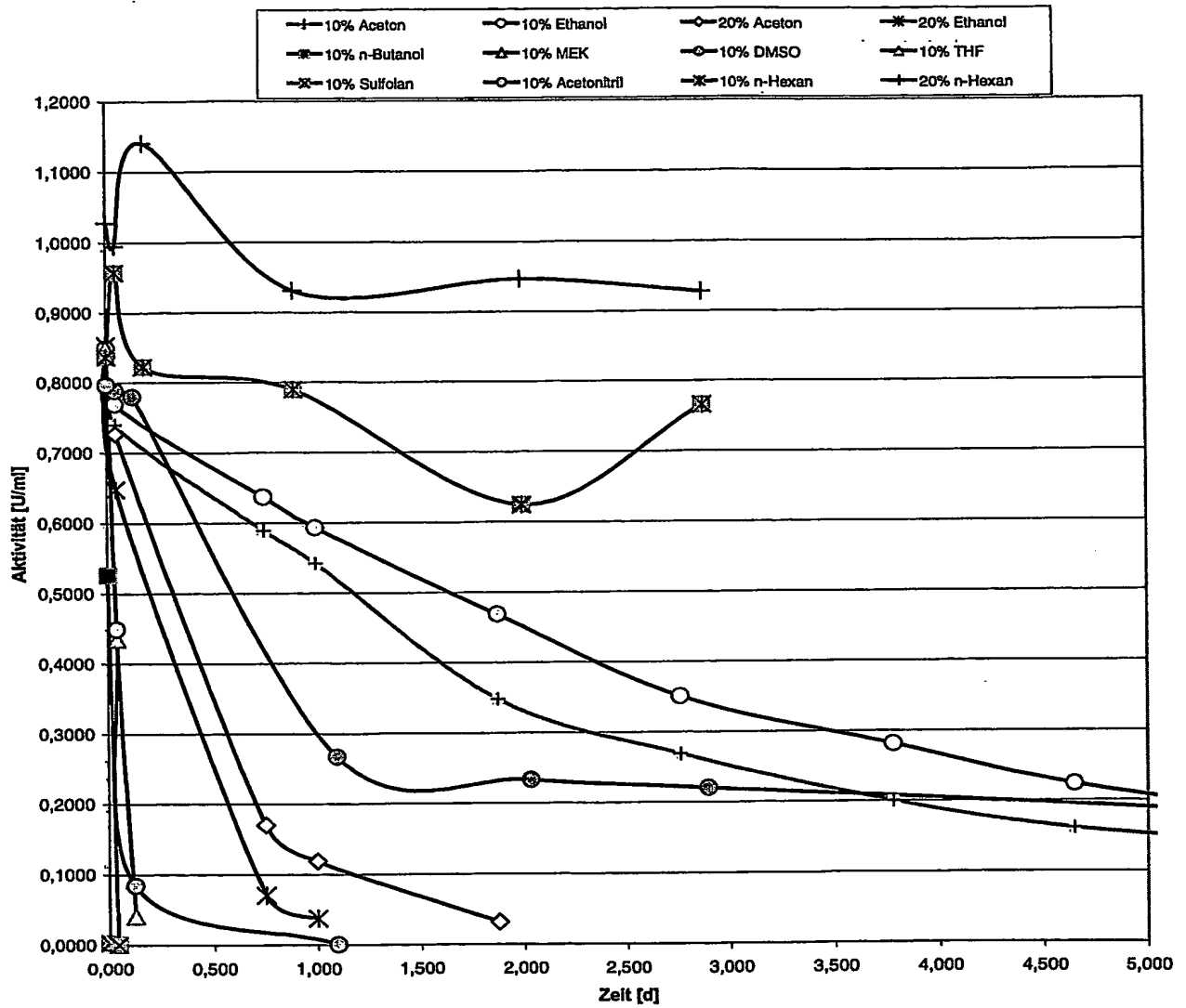


Fig. 2:

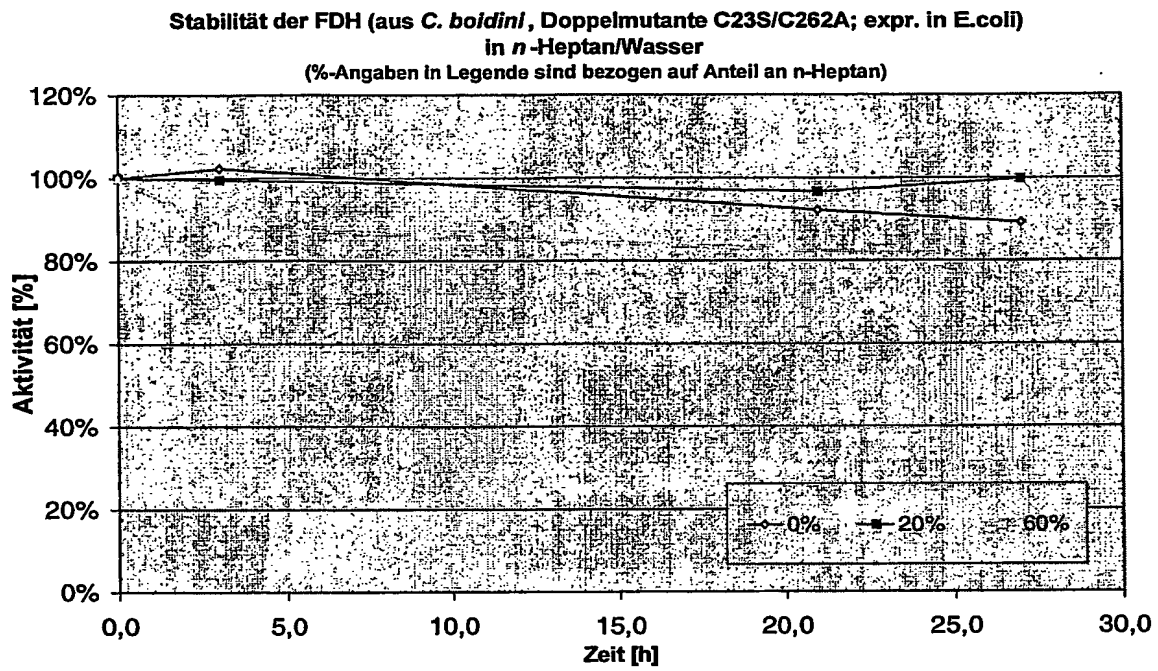


Fig. 3:

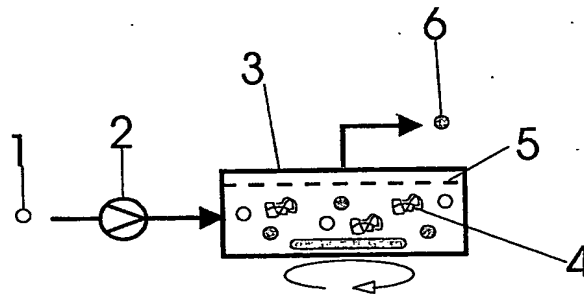


Fig. 4:

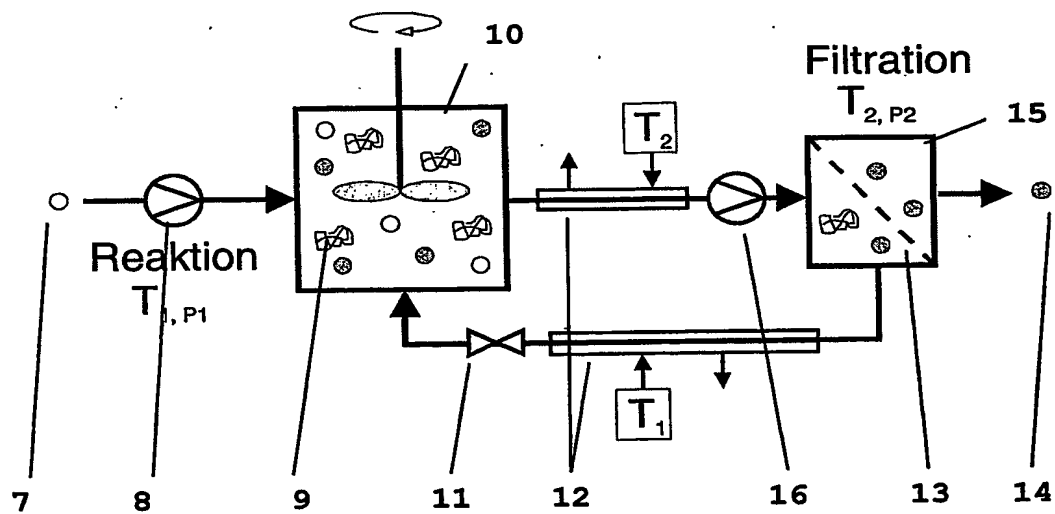
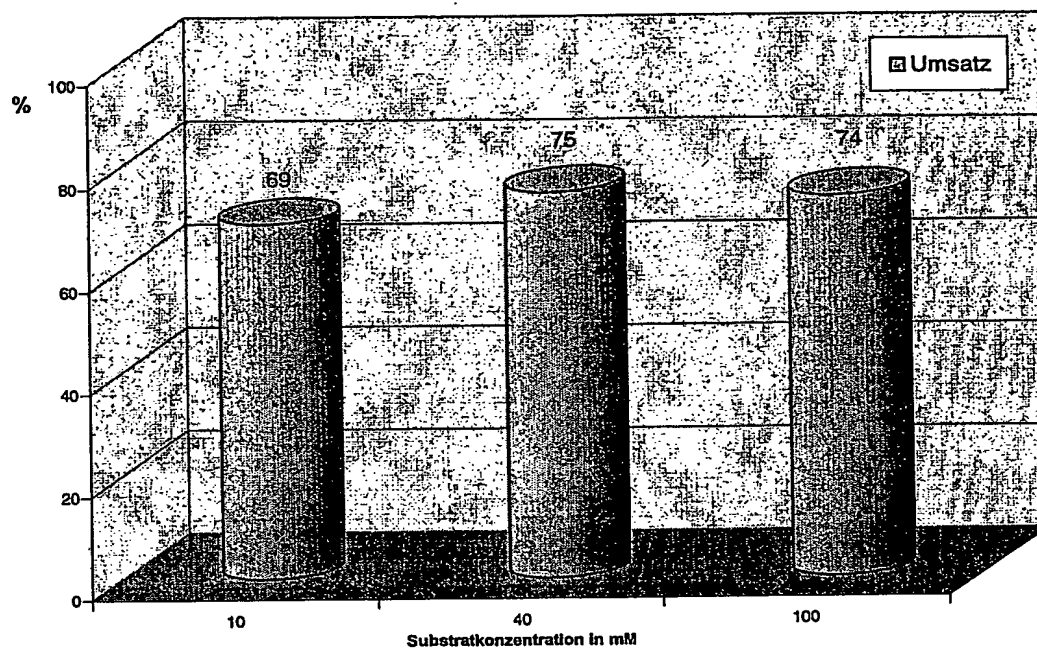


Fig. 5:



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.